

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental (*true experiment design*) dengan menggunakan metode *post test only control grup design* yaitu dilakukan skoring terhadap jumlah kematian sel Leydig setelah diberi perlakuan.

4.2 Lokasi dan Waktu Penelitian

Lokasi penelitian adalah Laboratorium Biomedik Universitas Muhammadiyah Malang Jalan Bendungan Sutami No.188 A Malang, Waktu penelitian direncanakan pada tahun 2019 selama 30 hari.

4.3 Populasi dan Sampel

4.3.1 Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) strain wistar yang didapat dari Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Malang

4.3.2 Sampel

Sampel diambil dari populasi tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan strain wistar dewasa sebagai hewan coba dengan kondisi sehat yang ditandai dengan gerak yang aktif dan mata yang jernih

4.3.3 Besar Sampel

Rentang besar sampel yang digunakan ditentukan dengan rumus :

$$DF = N - k = kn - k = k(n - 1)$$

Dimana DF merupakan *Degrees of freedom*, N adalah total sampel, n adalah total sampel di tiap kelompok, dan k adalah jumlah kelompok.

Sehingga, dengan formula diatas, besar sampel di tiap kelompok ditentukan dengan rumus :

$$n = DF/k + 1$$

Rentang DF yang bisa diterima adalah 10 sebagai nilai minimum dan 20 sebagai nilai maksimum. Sehingga rumus nya menjadi :

- Minimum $n = 10/k + 1 \rightarrow$ nilai minimum n penelitian ini $= 10/4 + 1 = 4$ sampel/grup
- Maksimum $n = 20/k + 1 \rightarrow$ nilai maksimum n penelitian ini $= 20/4 + 1 = 6$ sampel/grup

Dan rumus total sampel adalah :

- Minimum $N = \text{minimum } n \times k \rightarrow$ maka total sampel minimum : $4 \times 4 = 16$ sampel
- Maksimum $N = \text{maksimum } n \times k \rightarrow$ maka total sampel maksimum : $6 \times 4 = 24$ sampel

(Arifin & Zahiruddin, 2017)

Berdasarkan nilai minimum dan maksimum total sampel, maka rentang besar sampel pada penelitian ini adalah 16 - 24 sampel. Dimana jumlah sampel yang akan digunakan untuk penelitian ini adalah sebanyak 16 sampel yang dibagi menjadi 4 kelompok, sehingga setiap kelompok diisi oleh 4 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan strain wistar.

4.3.4 Teknik Pengambilan Sampling

Sampel diambil secara simple random sampling dari populasi tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan strain wistar dan diambil secara acak dengan undian. Kriteria yang dipilih adalah tikus yang berumur berkisar antara 2-3 bulan dengan berat 150-200gram, sehat, gerakan aktif dan mata yang jernih, kemudian dikelompokkan sesuai dengan perlakuan masing-masing.

4.3.5 Karakteristik Sampel Penelitian

4.3.5.1 Kriteria Inklusi

1. Subjek penelitian yaitu tikus putih jantan strain wistar
2. Berat badan hewan coba antara 150- 200gram
3. Umur hewan coba berkisar 2-3 bulan
4. Sehat, ditandai dengan gerakan yang aktif dan mata yang jernih

4.3.5.2 Kriteria Eksklusi

1. Tikus yang sakit selama proses adaptasi yang ditandai dengan gerakan yang tidak aktif
2. Tikus yang mati selama proses adaptasi

4.3.5.3 Kriteria Drop Out

1. Tikus yang sakit selama proses perlakuan yang ditandai dengan gerakan yang tidak aktif
2. Tikus yang mati selama proses perlakuan

4.3.6 Variabel Penelitian

4.3.6.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dari penelitian ini adalah paparan asap *e-cigarette* dan rokok konvensional.

4.3.6.2 Variabel Tergantung

Jumlah Sel Leydig pada gambaran histologi testis tikus *Rattus norvegicus*

4.3.7 Definisi Operational

Tabel 4.1 Definisi Operational

No	Variabel	Definisi Operasional Variabel	Hasil (Indikator) variabel	Ukur Cara Ukur Variabel	Alat Ukur	Skala Ukur Variabel
1	Jumlah sel leydig	Perhitungan jumlah sel leydig melalui gambaran secara histologis, dilakukan pengecatan <i>Hematoxilin-Eosin (HE)</i> dan dilihat melalui mikroskop dengan perbesaran 400x di bawah bimbingan ahli PA	Data disajikan sebagai rata-rata perslide	Jumlah sel yang berada diantar 3-4 tubulus seminiferus dalam 5 lapang pandang dengan perbesaran 400x. (Widhiantara & I wayan, 2015).	Mikroskop	Numerik (Ratio)
	Asap rokok	Pemberian asap rokok kretek kadar nikotin 2,3 mg, dan <i>e-cigarette</i> kadar nikotin 0 mg dan 3 mg,	1. Rokok kretek diberikan 10 batang dengan paparan 2 kali sehari selama 30 hari 2. <i>E-cigarette</i> diberikan dengan dosis 6 mL dengan paparan 2 kali sehari selama 30 hari	Diberikan dengan cara dipompa menggunakan <i>smoking pump</i>		Ordinal

4.4 Alat dan Bahan

- a. Alat dan Bahan untuk pemeliharaan tikus
 - Kandang pemeliharaan
 - Tempat makan
 - Tempat minum
 - Kawat kasa untuk penutup kandang
 - Timbangan
 - Pakan BR-1 dan aquades
- b. Alat dan Bahan untuk memberikan perlakuan
 - Sarung tangan
 - Kandang perlakuan + smoking pump
 - Rokok Elektronik
 - Liquid
- c. Alat untuk menghitung jumlah sel Leydig
 - Sarung tangan karet
 - Alat bedah minor
 - Tabung organ
 - Mikroskop cahaya
 - Kamera
 - Object glass + Cover glass

4.5 Prosedur Penelitian

4.5.1 Pembagian Kelompok Tikus

Tikus yang digunakan sejumlah 16 ekor yang dibagi menjadi 4 kelompok dan setiap kelompok terdiri dari 4 ekor tikus :

1. Kelompok 1 : Kontrol negatif dengan pemberian pakan standar BR-1 dan minum standar tanpa pemberian paparan asap rokok konvensional dan asap rokok elektronik selama 30 hari.
2. Kelompok 2 : Pemberian pakan standar BR-1 dan minum standar dengan pemberian paparan asap rokok konvensional kretek 10 batang dalam 2 kali pemaparan perhari selama 30 hari.
3. Kelompok 3 : Pemberian pakan standar BR-1 dan minum standar dengan pemberian paparan asap rokok elektronik dengan dosis 0 mg nikotin dalam 2 kali pemaparan perhari selama 30 hari.
4. Kelompok 4 : Pemberian pakan standar BR-1 dan minum standar dengan pemberian paparan asap rokok elektronik dengan dosis 3 mg nikotin dalam 2 kali pemaparan perhari selama 30 hari.

4.5.2 Adaptasi Hewan Coba

Tikus yang diperoleh segera dimasukkan kedalam kandang yang telah disediakan dan adaptasi berlangsung selama 7 hari. Setiap minggu kandang dibersihkan dengan memberikan desinfektan pada lantainya dan setiap hari diberikan makan dan aquades secara *ad libitum* (tak terbatas) (Alexandru, 2011)

4.5.3 Pemaparan Asap Rokok Elektronik dan Konvensional

Pemaparan asap rokok elektronik dan konvensional dilakukan setiap hari. Setiap kelompok dipapar asap rokok elektronik sebanyak 6ml liquid nikotin dan konvensional sebanyak 10 batang sehari (Armidha, et al., 2012). Setiap perlakuan paparan dilakukan dalam *smoking box* dan *smoking pump*. Bagian pangkal rokok elektronik dan konvensional dimasukkan kedalam selang kecil yang dihubungkan dengan pompa balon, kemudian rokok elektronik dan konvensional dinyalakan bersamaan. Ujung lain pompa balon dihubungkan dengan selang berukuran sama, kemudian dimasukkan kedalam kandang perlakuan/ *smoking box*. Setelah perlakuan selesai, hewan coba dapat dikeluarkan dari kandang perlakuan

4.5.4 Cara Pembuatan Sediaan Histologi Tikus

Setelah tikus dibius atau dalam keadaan pingsan, dengan gunting bedah testis diangkat dengan hati hati setelah daerah perineum dibuka sebelumnya. Kemudian testis dipisahkan, difiksasi pada larutan buffer formalin 10% selama 3 jam, lalu dilakukan dehidrasi dengan tujuan menghilangkan air agar jaringan tidak mengkerut. Mula-mula pada alkohol 80% selama 1 jam, kemudian dimasukkan ke dalam alkohol 95% selama 1 jam yang kemudian diulang lagi 2 kali, kemudian dimasukkan ke dalam alkohol 100% pertama (I) selama 1 jam, kedua (II) selama 1 jam, ketiga (III) selama 1 jam dan keempat (IV) selama 1 jam. Proses clearing dimasukkan ke dalam xylol sebanyak 2 kali, pertama (I) selama 1 jam dan xylol kedua (II) selama 2 jam, kemudian impregnasi/embedding dengan memasukkan ke dalam parafin pertama (I) selama 21/2 jam dan parafin kedua (II) selama 4 jam. Kemudian dibuat blok parafin

dan disimpan dalam almari es. Selanjutnya blok paraffin dipotong dengan mikrotom setebal 5 mikron dan selanjutnya dilakukan *staining*/pewarnaan. Pewarnaan sediaan testis dengan HE (Hematoxylin-Eosin), dengan cara (I) pertama, deparafinisasi dengan xylol, hidrasi dengan serial alkohol 100% (2 x 2 menit)-95% (2 menit)-90% (2 menit)-80%(2 menit)-70%(2 menit) lalu diwarnai dengan hematoxylin selama 1 menit, lalu cuci dengan air keran beberapa menit sampai air bersih, kemudian diwarnai dengan eosin biarkan selama 5 menit, lalu cuci 2 kali dengan alkohol 75%, kemudian dilakukan dehidrasi dengan alkohol 95%, kemudian bersihkan dengan xylene selanjutnya dilakukan mounting menggunakan entelan (Widhiantara & Rosiana, 2015)

4.5.5 Perhitungan Jumlah Sel Leydig

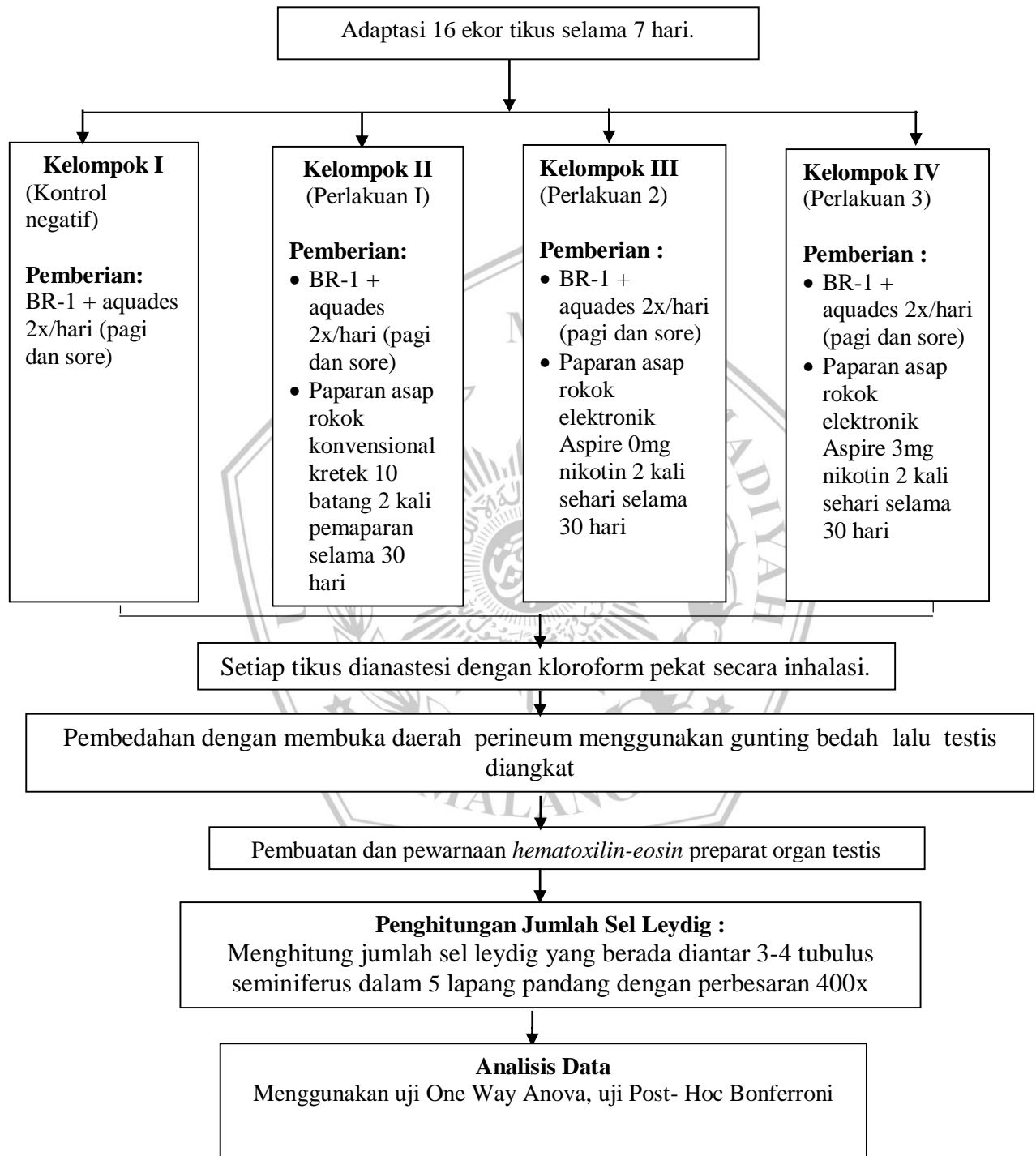
Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan sebelumnya, perhitungan jumlah sel Leydig dilakukan dengan cara menghitung jumlah sel leydig yang berada diantar 3-4 tubulus seminiferus dalam 5 lapang pandang dengan perbesaran 400x (Widhiantara & Rosiana, 2015)

4.5.6 Penanganan Hewan Coba Setelah Dilakukan Pembedahan

Setelah hewan coba dibedah, pastikan bahwa tidak akan terjadi *recovery* pada hewan coba. Kemudian pastikan bahwa denyut nadi sudah benar-benar berhenti. Jika hewan coba mengalami *recovery*, lakukan prosedur euthanasia, salah satunya dengan prosedur *Cervical Dislocation*. Teknik ini dilakukan dengan memberikan tekanan ke bagian posterior dasar tulang tengkorak dan vertebrae. Bila vertebrae terpisah dari otak, rangsangan rasa sakit menghilang sehingga hewan

tidak merasakan sakit. Selanjutnya hewan coba yang sudah dipastikan mati, dikumpulkan menjadi satu lalu dikubur (Alexandru, 2011)

4.6 Alur Penelitian



4.7 Analisis Data

Data-data yang telah dikumpulkan kemudian dianalisa menggunakan uji normalitas, uji homogenitas, uji komparasi, uji *post hoc test Bonferroni*, dan juga uji regresi yang pengolahannya menggunakan SPSS 24 :

1. Uji normalitas dilakukan dengan tujuan untuk menilai sebaran data normal atau tidak, dengan menggunakan uji *Saphiro-Wilk* dikarekan besar sampel yang digunakan ≤ 50 . Sebaran data dikatakan normal apabila $\text{sig} > 0,05$. Apabila sebaran data mempunyai distribusi tidak normal, maka dilakukan transformasi data terlebih dahulu. Apabila hasil data normal, dilanjutkan dengan uji komparatif dengan One Way Anova dan uji Post-Hoc.
2. Uji homogenitas bertujuan untuk mengetahui perbedaan dua atau lebih populasi atau varian data, menggunakan uji *Levene Test*. Data dikatakan homogen apabila $\text{sig} > 0,05$.
3. Uji *One Way Anova* yang bertujuan untuk menguji hipotesis kesamaan rata-rata antar kelompok (> 2 kelompok dan tidak berpasangan) dan untuk menguji apakah rata-rata antar sampel berbeda secara signifikan. Bila diperoleh $\alpha > 0,05$ artinya tidak ada perbedaan yang bermakna, namun sebaliknya bila $\alpha < 0,05$ menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna.
4. Uji Post Hoc Bonferroni merupakan uji kelanjutan dari uji *One Way Anova*, digunakan untuk mengetahui perbedaan yang bermakna antara kelompok perlakuan dalam penelitian.

